

CROMATOGRAFIA IN FASE LIQUIDA AD ELEVATE PRESTAZIONI

La cromatografia in fase liquida a elevate prestazioni (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), rappresenta la naturale evoluzione strumentale della cromatografia su colonna a bassa pressione

CLASSIFICAZIONE DELLE TECNICHE HPLC

- *cromatografia normale* (Normal Phase Chromatography, NPC);
 - *cromatografia a fase inversa* (Reverse Phase Chromatography, RPC).
-
- *cromatografia di adsorbimento liquido-solido* (Liquid-Solid Chromatography, LSC);
 - *cromatografia di ripartizione liquido-liquido* (Liquid-Liquid Chromatography, LLC)
 - *cromatografia di esclusione* (Size Exclusion Chromatography, SEC);
 - *cromatografia di scambio ionico* (Ion Exchange Chromatography, IEC)
 - *cromatografia ionica* (Ion Chromatography, IC);
 - *cromatografia di affinità* (Affinity Chromatography, AFC);
 - *cromatografia di coppia ionica* (Ion Pair Chromatography, IPC).;
-
- *cromatografia su fase legata* [Konded Phase Chromatography, BPC);
 - *cromatografia su fase chirale* (Chiral Phase Chromatography, CPC).

GRANDEZZE, PARAMETRI E PRESTAZIONI

- fattore di ritenzione
- selettività
- efficienza
- risoluzione
- capacità
- tempi di lavoro

TEMPO E VOLUME DI RITENZIONE

$$t'_R = t_R - t_M$$

$$V'_R = V_R - V_M$$

$$V_R = t_R F_C$$

$$V'_R = t'_R F_C$$

In HPLC, il tempo e il volume di ritenzione sono correlati fra loro in modo molto più semplice che in GC, perché i liquidi sono praticamente incomprimibili

COEFFICIENTE DI DISTRIBUZIONE, FATTORE DI RITENZIONE E RAPPORTO DI FASE

$$K_C = \frac{V_M}{V_S} k$$

$$K_C = \beta k$$

In HPLC si può operare sulla polarità (e quindi sul potere solvente) di entrambe le fasi, e in questo modo si modifica il coefficiente di distribuzione

Oppure si può agire sulla quantità di fase stazionaria (V_S) presente in colonna, e in questo modo si modifica il fattore di ritenzione (k)

Le migliori prestazioni in termini di efficienza e risoluzione si ottengono quando k è compreso fra 1,5 e 5, ma in pratica si ottengono buoni risultati con k compreso fra 1 e 15.

SELETTIVITÀ

La selettività, definita come **capacità del sistema cromatografico di eluire due sostanze in tempi diversi**, è espressa dal fattore di separazione (α):

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{C2}}{K_{C1}}$$

In HPLC si può lavorare **in gradiente di polarità**, corrisponde, nei risultati, all'analisi in temperatura programmata tipica della GC

Il fatto di lavorare con una fase mobile liquida e a bassa temperatura consente di sfruttare l'efficacia selettiva di fasi stazionarie termolabili, come le resine a scambio ionico e molti gel, che invece non sono utilizzabili in GC.

EFFICIENZA

Tra i fattori determinanti per l'efficienza di un sistema per HPLC quello di gran lunga più importante è legato a:

- Numero dei piatti teorici (N)
- Altezza equivalente al piatto teorico (H),

$$H = \frac{L}{N}$$

Quindi per migliorare l'efficienza di una colonna si possono effettuare due tipi di intervento:

1. aumentare la lunghezza;
2. abbassare il valore di H agendo su opportuni parametri operativi.

Condizioni per minimizzare H:

La velocità lineare della fase mobile deve essere sufficientemente alta

Il diametro delle particelle della fase stazionaria deve essere piccolo (cioè la granulometria deve essere fine) in modo da ridurre il valore del termine A e di C_M .

Lo spessore del liquido di ripartizione (o dello strato attivo) deve essere sottile, per ridurre il valore di C_s .

La viscosità della fase mobile deve essere bassa, per aumentare la permeabilità e quindi ridurre la caduta di pressione.

La temperatura deve essere relativamente alta, perché i coefficienti di diffusione devono essere elevati per ridurre il terzo termine

RISOLUZIONE

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}} \quad R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 - k_2} \right)$$

In HPLC il risultato pratico è che complessivamente le variazioni di temperatura fanno peggiorare la risoluzione, pur senza peraltro incidere in modo notevole (come invece accade in GC) su di essa.

Di fatto molte separazioni vengono condotte a temperatura ambiente!!!

TEMPI DI LAVORO E CAPACITA'

I **tempi di lavoro** dipendono dall'affinità delle sostanze da separare per la fase stazionaria e dalla velocità lineare (o dal flusso) della fase mobile

Nella pratica, per le colonne di più largo impiego (1÷4 mm ID) si opera con flussi di 0,5÷2 mL/min, in condizioni isocratiche (per la separazione di pochi componenti) oppure in gradiente (per la separazione di campioni complessi).

La **capacità di carico** di una colonna per HPLC varia sensibilmente secondo che sia di tipo analitico o preparativo.

Nel primo caso si possono iniettare di solito da poche decine fino ad alcune centinaia di nanogrammi di sostanza, mentre nel secondo si arriva fino a 500 mg.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE FASI

E' la coppia **fase stazionaria/fase mobile** a decidere del successo di una separazione

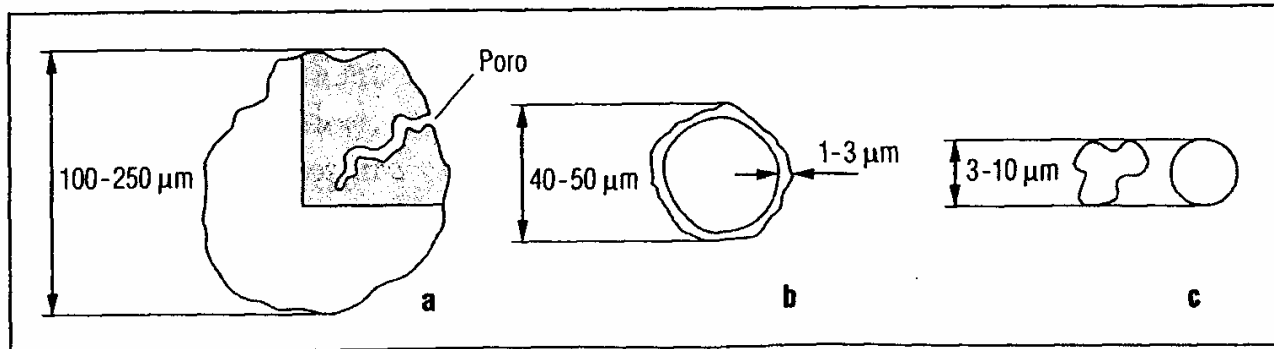
Qualunque scelta dovrà dunque tenere conto di queste due variabili oltre che delle caratteristiche geometriche della colonna.

FASE STAZIONARIA

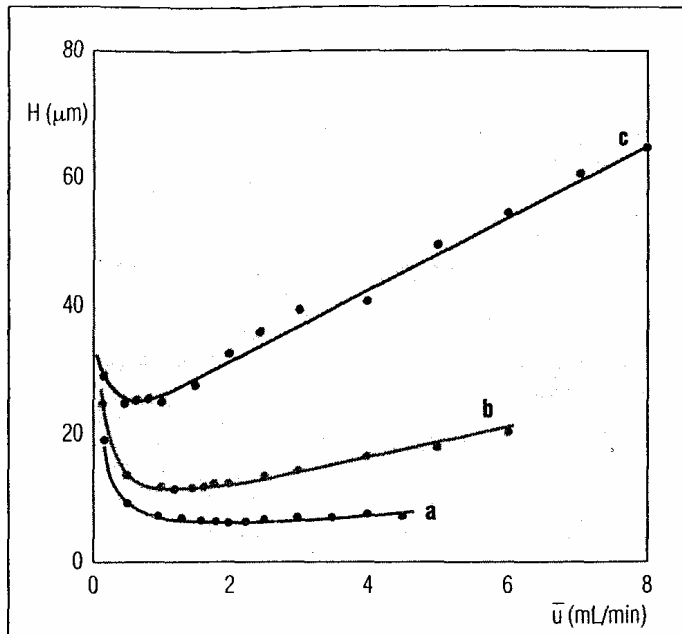
In HPLC si usano riempimenti a **granulometria nettamente più fine** rispetto alla LPC. Ciò consente di migliorare le prestazioni e in particolare di agire sull'efficienza della separazione.

I riempimenti sono di due tipi:

- *particelle pellicolari*
- *microparticelle porose.*



Fase stazionaria: (a) particella porosa di grandi dimensioni per LPC; (b) particella pellicolare per HPLC; (c) microparticelle (irregolari o sferiche) per HPLC.



Andamento della funzione $H = f(u)$ al variare della granulometria per il *t*-butilbenzene. Fase stazionaria legata C18; fase mobile: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (65/35).
T.a.(a) Colonna 100 x 4,6 mm ID; particelle da 3 μm . $k' = 6,4$. (b) Colonna 125 x 4,6 mm ID; particelle da 5 μm . $k' = 6,6$. (c) Colonna 250 x 4,6 mm ID; particelle da 10 μm , $k' = 6,2$.